



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C11B 3/00, C12N 9/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/05219 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Februar 1997 (13.02.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01190 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juli 1996 (04.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 27 274.9 26. Juli 1995 (26.07.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RÖHM GMBH [DE/DE]; Kirschenallee, D-64293 Darmstadt (DE). METALLGESELLSCHAFT AG [DE/DE]; Reuterweg 14, D-60323 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖFFLER, Fridolin [DE/DE]; Karl-Henkelmann-Weg 4, D-64625 Bensheim (DE). PLAINER, Hermann [AT/DE]; Am Wembach 15, D-64354 Reinheim (DE). SPRÖSSLER, Bruno [DE/DE]; Auf der Schmelz 93, D-64380 Roßdorf (DE). OTTOFRICKENSTEIN, Hans [DE/DE]; Annastrasse 60, D-64673 Zwingenberg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, CN, CZ, HU, JP, MX, PL, RU, TR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	
<p>(54) Title: VEGETABLE OIL ENZYMATIC DEGUMMING PROCESS BY MEANS OF ASPERGILLUS PHOSPHOLIPASE (54) Bezeichnung: ENZYMATISCHES VERFAHREN ZUR ENTSCHEIMUNG VON PFLANZLICHEN ÖLEN MIT ASPERGILLUS- PHOSPHOLIPASE (57) Abstract A degumming step in the production of edible oils is disclosed. Vegetable oils from which hydratable phosphatides have preferably been eliminated by a previous aqueous degumming process, are freed from non-hydratable phosphatides by an enzymatic treatment, so that they may be physically refined. The main characteristic of the invention is the use of phospholipase from an <i>Aspergillus</i> strain. The process is gentle, economical and environment-friendly. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft den Verfahrensschritt der Entschleimung bei der Herstellung von Speiseölen, wobei pflanzliche Öle, denen die hydratisierbaren Phosphatide vorzugsweise durch eine vorgeschaltete wäßrige Entschleimung weitgehend entzogen worden waren, durch eine Enzymbehandlung von nicht hydratisierbaren Phosphatiden soweit befreit werden, daß sie einer physikalischen Raffination unterzogen werden können. Wichtigstes Kennzeichen der Erfindung ist die Verwendung von Phospholipase aus einem <i>Aspergillus</i>stamm. Das Verfahren ist schonend, kostensparend und umweltfreundlich.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

BESCHREIBUNG

Enzymatisches Verfahren zur Entschleimung von pflanzlichen Ölen mit *Aspergillus*-Phospholipase

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft den Verfahrensschritt der Entschleimung bei der Herstellung von Speiseölen, wobei pflanzliche Öle, denen die hydratisierbaren Phosphatide vorzugsweise durch eine vorgeschaltete wäßrige Entschleimung weitgehend entzogen worden waren, durch eine Enzymbehandlung von nicht hydratisierbaren Phosphatiden soweit befreit werden, daß sie einer physikalischen Raffination unterzogen werden können. Das Verfahren ist schonend, kostensparend und umweltfreundlich.

Stand der Technik

Die anerkannten Raffinationsverfahren zur Herstellung von Speiseölen höchster Qualität umfassen üblicherweise die Verfahrensschritte der Entschleimung, der Entsäuerung, sowie der Bleichung und der Desodorierung. Große Anstrengungen wurden in letzter Zeit unternommen, um insbesondere das Entschleimungsverfahren effizienter und kostengünstiger zu gestalten. Das angestrebte Ziel dabei ist, das Öl soweit zu entschleimen, daß es anschließend destillativ entsäuert werden kann. Letzteres destillatives Entsäuerungsverfahren hat gegenüber dem herkömmlichen Verfahren der Entsäuerung durch Neutralisation den großen Vorteil, daß kein Abfall entsteht. Voraussetzung für seine Durchführung ist aber ein sehr niedriger Gehalt an Phosphatiden, z.B.

-2-

ein Phosphorgehalt von weniger als 15ppm im Öl, bevorzugt von weniger als 10 ppm. Ideal sind Phosphorgehalte von <5 ppm.

Die Schleimstoffe der Pflanzenöle bestehen hauptsächlich aus Gemischen von Phosphatiden, deren Menge und Zusammensetzung von der Ölsaart und der Art der Ölgewinnung abhängt. Der weitaus größte Teil der Phosphatide läßt sich durch Hydratation aus ihren micellaren Lösungen in den Rohölen abtrennen und zur Lecithingewinnung verwenden. Man spricht dabei von Naßentschleimung. Ein kleiner Teil der Phosphatide ist nicht hydratisierbar und verbleibt im Öl. Die chemische Natur dieser "nicht hydratisierbaren Phosphatide (NHP) ist nicht restlos aufgeklärt. Untersuchungen haben ergeben, daß sie zu über 50% aus Calcium- und Magnesiumsalzen von Phosphatidsäuren bestehen (Siehe Hermann Pardun, Die Pflanzenlecithine, Verlag für chem. Industrie H. Ziolkowsky KG, Augsburg, 1988, Seite 181).

Das Ziel gängiger technischer Entschleimungsverfahren ist es, die nicht hydratisierbaren Phosphatide so weit wie möglich aus dem Öl zu entfernen. Zu den heute üblichen Verfahren gehören das "Superdegumming Verfahren" und das "Unidegumming" Verfahren von der Firma Unilever, das "Total Degumming ("TOP") Verfahren" der Firma Vandemoortele, das "Alcon-Verfahren" der Firma Lurgi und das "UF-Verfahren" der Firma Krupp Maschinentechnik GmbH. Vielfach ist die klassische Wasserentschleimung zur Entfernung der hydratisierbaren Phosphatide in diesen Verfahren integriert oder ihnen vorgeschaltet.

Typisch für alle diese Entschleimungsverfahren ist, daß ausschließlich rein mechanische oder physikalisch-chemische Methoden angewandt werden, die nicht immer für alle Ölqualitäten optimal geeignet sind. Der apparative Aufwand und der Energieaufwand sind für diese Verfahren hoch, zudem

ist nicht garantiert, daß die für eine nachfolgende destillative Entsäuerung notwendigen niedrigen Phosphorgehalte erzielt werden.

Bei einem Teil dieser Entschleimungsverfahren wird als wirksames Prinzip eine Säurebehandlung angewandt. Es ist bekannt, daß stark saure Agentien zur Nachentschleimung von mit Wasser vorentscheideten Ölen geeignet sind (vgl. Pardun, loc. cit., Seiten 185-189 oder US-A 4 698 185). Bevorzugt wird dabei Citronensäure eingesetzt.

In der europäischen Patentanmeldung 0 513 709 wird erstmals ein wirksames enzymatisches Verfahren zur Entschleimung vorgestellt. Dabei wird ein mit Wasser vorentscheidetes Speiseöl mit einer wäßrigen Lösung einer Phospholipase (A₂, A₁, B) emulgiert und von dieser wäßrigen Phase abgetrennt. Das Öl enthält nach diesem Prozeß weniger als 5 ppm Phosphor und ist für die nachfolgende destillative Entsäuerung geeignet. Wichtige Prozeßparameter sind eine Emulgierung der enzymhaltigen Wasserphase zu Tröpfchen < 10 Mikrometer, der Zusatz von Citrat zur wäßrigen Lösung, eine Temperatur von 50 bis 70 °C, und ein pH-Wert bevorzugt von 4 bis 6. Diese pH-Einstellung im Säuren ist überraschend, denn die pH-Optima aller bekannten Phospholipasen liegen bei pH 8. Das enzymatische Entschleimungsverfahren wurde als "EnzyMax-Verfahren" von der Firma Lurgi in der Speiseölindustrie eingeführt.

In der DE-A 43 39 556 wird als weitere Variante dieses Verfahrens die Wiederverwendung des Enzyms beschrieben, indem man es aus einer gebrauchten, schlammhaltigen wäßrigen Phase durch Zusatz von Tensiden oder Lösungsvermittler ablöst und als weitgehend schlammfreie Lösung, die mindestens 10% des eingesetzten Enzyms enthält, wiedergewinnt.

Im "EnzyMax-Verfahren" kann die vorteilhafte Wirkung der Citronensäure für eine weitgehende Entschleimung benutzt werden, und zwar durch eine

der Enzymbehandlung vor- oder nachgeschaltete Citronensäurebehandlung. Der gleichzeitige Einsatz von Citronensäure und Enzym ist nicht möglich.

Aus der JP-A 2-153997 ist es bekannt, rohes oder vorentschleimtes Öl mit einem Enzym, das Phospholipase-A-Aktivität aufweist, zu behandeln. Dieser Stand der Technik lehrt, daß durch den Einsatz von Phospholipase A die Phosphatide so verändert werden, daß sie durch Adsorbentien wie Aktivton oder Bleicherde leicht entfernt werden können. So wird in Beispiel 1 und 2 von 3 Durchführungsbeispielen die Enzymbehandlung mit einer Bleicherdebehandlung kombiniert. Im 3. Beispiel wird auf den Einsatz von Bleicherde verzichtet. Statt dessen werden hier besonders große Mengen Enzym (2000-20000 Einheiten) in großen Mengen Wasser (100-1000 Gew.-% bez. auf das Öl) eingesetzt. Dabei stellt sich eine Öl-in-Wasser-Emulsion ein. Es wird keine Lehre zur Verteilung des Öls in der enzymhaltigen Wasserphase, zur Einstellung des pH-Wertes, zur Mitverwendung von Citrat, sowie zur Wiederverwendung des Enzyms gegeben.

In der JP-A 2-49593 wird eine ähnliche Enzymbehandlung von Ölen beschrieben, die indessen nicht auf die Entschleimung des Öls, sondern auf die Gewinnung von Lysolecithin abzielt. Dabei ist die Einstellung besonderer pH-Werte überflüssig.

Auch beim Verfahren gemäß EP-A 0 328 789 geht es um die Umwandlung des Lecithins des Sojaöls zu Lysolecithin durch Phospholipase A zur Herstellung von mayonnaise-artigen Produkten.

Die EP-A 0 622 446 beschreibt ein enzymatisches Verfahren zur Entschleimung von Öl und Fett, das mehrere Verfahrensschritte beinhaltet. Nach der Behandlung mit Phospholipase wird die Enzymlösung abzentrifugiert, das verbleibende Öl mit Wasser von pH 3-6

gewaschen und schließlich mit Bleicherde behandelt. Kennzeichnend ist dabei, daß sowohl bei der Enzymbehandlung, als auch beim Waschschrift große Mengen Wasser, nämlich 30-200 Gewichts-% bezogen auf das eingesetzte Öl eingesetzt werden. Auch hier entstehen Öl-in-Wasser-Emulsionen. Dies bedeutet erhöhten apparativen Aufwand, denn es müssen große Volumina an Flüssigkeit bewegt werden, sowie höhere Energie- und Entsorgungskosten. Für die pH-Einstellung der wäßrigen Enzymlösung wird keine Lehre gegeben.

Die Bereitstellung der erforderlichen Menge an Enzym für die Betreibung eines großtechnischen enzymatischen Verfahrens ist ein spezifisches Problem im Falle der Phospholipase. Hier ist die verfügbare Menge beschränkt. Phospholipase A₁ ist nicht im Handel erhältlich, Phospholipase B nur in Labormengen; Quellen sind Extrakte aus Rattenleber oder aus Streptomyces-Kulturen. Phospholipase A₂ kommt im Schlangen-, Skorpions- und Bienengift vor.

Alle diese Quellen sind nicht für die Erzeugung technisch relevanter Enzymmengen geeignet. Das derzeit einzige technische Herstellverfahren für Phospholipase A₂ ist die Extraktion aus Schweine-Pankreasdrüsen. Weltweit ist das Aufkommen an geeigneten Drüsen aber eng begrenzt und auf keinen Fall beliebig vermehrbar. Zudem ist Phospholipase bei dem Extraktionsverfahren nur ein untergeordnetes Nebenprodukt. Hauptprodukte sind Pankreasproteasen, insbesondere Trypsin, sowie auch Schweineinsulin. Es wird geschätzt, daß das derzeitige - und kaum vermehrbare - Handelsvolumen an Phospholipase A₂ für nicht mehr als zwei bis drei Ölmühlen ausreichen würde, selbst wenn man das Enzym, wie in EP-A 0 513 709 beschrieben, im Prozeß wiederverwendet.

Es besteht somit Bedarf nach einer Quelle, die das Enzym in unbeschränkter Menge bereitstellt. Technische Enzyme werden nach dem Stand der Technik in beliebiger Menge aus Mikroorganismen, z.B. aus Pilzen oder Bakterien gewonnen. Für Phospholipasen A₁, A₂ und B ist

-6-

derzeit kein Mikroorganismus bekannt, der die Produktion dieses Enzyms mit ausreichender Ausbeute lohnt. Isoliert wurde Phospholipase A₁ aus *Rhizopus arrhizus*, *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium*, Phospholipase B aus *Penicillium notatum* und *Streptomyces*stämmen. . Überraschenderweise findet sich in der Literatur kein Hinweis, daß Phospholipase A₁, A₂ oder B aus *Aspergillus* isoliert werden kann.

Dagegen sind Lysophospholipasen, die aus *Aspergillus niger* gewonnen werden, aus EP 0 219 269 bekannt. Lysophospholipasen - sie werden hier als Phospholipase L₁ bzw. L₂ bezeichnet - besitzen eine gegenüber den oben genannten Phospholipasen unterschiedliche Spezifität insofern, als sie ausschließlich Monoacylphosphatide zu spalten vermögen, wie z.B. Lysolecithin. Reine Lysophospholipasen finden auf einem ganz anderen Gebiet der Lebensmitteltechnologie Anwendung, nämlich zur Verbesserung der Ausbeute bei der Weizenstärkefiltration.

Aufgabe

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein schonendes, umweltfreundliches und kostengünstiges Verfahren zur Verminderung des Gehaltes an phosphorhaltigen Bestandteilen in pflanzlichen Ölen bis zu einem Grad, der eine Weiterbehandlung des Öles durch destillative Entsäuerung ermöglicht, also bis zu Phosphorgehalten von weniger als 15 ppm, bevorzugt von weniger als 10 ppm, im besten Fall von weniger als 5 ppm bereitzustellen. Diese Forderungen können durch ein enzymatisches Verfahren erfüllt werden.

Es besteht dabei Bedarf nach einer mikrobiellen Quelle, die erlaubt, das Enzym Phospholipase in unbeschränkter Menge zu produzieren. Nach

-7-

dem Stand der Technik sind ausschließlich Enzyme mit acylspaltender Spezifität dafür brauchbar, nämlich Phospholipase A₁, A₂, und B. Dabei ist es von nicht zu unterschätzendem Vorteil, einen enzymproduzierenden Mikroorganismus zu verwenden, der in der Lebensmitteltechnologie seit langem eingeführt und daher unbedenklich ist. Beispiele hierfür sind verschiedene Hefestämme wie *Kluyveromyces cerevisiae*, Bacillusstämme wie *B. subtilis* oder Aspergillusstämme wie *A. niger* oder *oryzae*.

Eine weitere, bisher nicht gelöste Aufgabe ist es, im Entschleimungsprozeß die vorteilhafte Wirkung von zwei bekannten Prozessen, nämlich die der Säurebehandlung und der Enzymbehandlung, in einem Schritt zu vereinigen.

Schließlich stellt sich die Aufgabe, mit möglichst geringen Einsatzmengen an Enzym und Säure auszukommen, um dadurch das Verfahren besonders wirtschaftlich zu gestalten zu können.

Lösung

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Verminderung von in pflanzlichen Ölen enthaltenen phosphorhaltigen Bestandteilen durch deren enzymatischen Abbau mit acylspaltenden Phospholipasen, dadurch gekennzeichnet, daß ein aus *Aspergillus* stammendes Enzym eingesetzt wird.

Die Herstellung von technischen Enzymen durch Kultivierung von *Aspergillus*-Stämmen ist ein wichtiger und hochentwickelter Bereich in der Biotechnologie. So werden Enzyme aus *Aspergillus niger* u. a. in der Stärkeindustrie (Amyloglucosidasen), in der Fruchtsaftindustrie (Pectinasen) und in der Backwarenindustrie (Xylanasen) in großem

Maßstab eingesetzt. Enzyme aus *Aspergillus*, insbesondere aus *A. niger* sind in der Lebensmitteltechnologie schon lange eingeführt und als unbedenklich bekannt. Phospholipasen A₁, A₂, oder B aus dieser Quelle sind nicht bekannt. Die Verwendung von Phospholipasen dieser Herkunft im Entschleimungsverfahren ist ein wichtiges Kennzeichen der vorliegenden Erfindung. Bei der Suche nach Phospholipase enthaltenden Stämmen wurde in den Verkaufsprodukten der Anmelderin VERON® 191 oder ROHAPECT® 7104 ausreichende Phospholipase A₂-Aktivität gefunden. Höhere Aktivitäten erbringt die an sich bekannte Screeningmethode der Stammverbesserung durch Mutation und Selektion auf erhöhte Phospholipase Aktivität (siehe W. Gerhartz, "Enzymes in Industry", VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990, Seite 35).

Die Spezifität der aus dieser Quelle gewonnenen Phospholipase kann vielseitig und komplex sein. Anders als bei der aus dem Stand der Technik bekannten Phospholipase A₂ aus Pankreas, die definitionsgemäß nur die Acylgruppe am C₂-Atom eines Phospholipidmoleküls spaltet, enthalten Phospholipasen aus *Aspergillus* meist verschiedene acylspaltende Spezifitäten gleichzeitig. So wird neben einer A₁- und A₂-Spezifität auch eine Lysophospholipase-Aktivität gefunden. Den genannten Enzymspezifitäten entsprechen die E.C.-Nummern 3.1.1.32, 3.1.1.4 und 3.1.1.5. Lysophospholipase (EC-Nr. 3.1.1.5) wird auch als Phospholipase B bezeichnet; es ist aber nach Darstellung in der Literatur (vgl. Pardun, loc.cit., Seite 140) unklar, ob zwischen Lysophospholipase und Phospholipase B unterschieden werden muß. Gemeinsam ist ihnen jedenfalls, daß sie Lysolecithin weiter zu spalten vermögen und zwar bis zum Glycerophosphorylcholin. Phospholipase B vermag zusätzlich auch Lecithin anzugreifen. Da die erfindungsgemäße Phospholipase diese beiden Spezifitäten besitzt, nämlich sowohl für das Substrat Lecithin, als auch für das Substrat Lysolecithin, könnte man sie als Phospholipase B bezeichnen. Reine Lysophospholipasen aus *Aspergillus*, die nur Lysolecithin zu spalten

vermögen, nicht aber Lecithin, sind im vorliegenden Entschleimungsprozeß, insbesondere unter den sauren Reaktionsbedingungen, nach den bisherigen Erkenntnissen der Anmelderin wirkungslos. Das gilt auch für die nicht acylspaltenden Phospholipasen C und D.

Somit ist die Spezifität für Lecithin, also Phospholipase A₁ und/oder A₂ Aktivität - es ist schwer, analytisch zwischen beiden zu unterscheiden - ein wesentliches Kennzeichen des erfindungsgemäßen Enzyms. Das gleichzeitige Vorhandensein dieser verschiedenen Spezifitäten könnte ein Grund für die vorteilhafte Wirkung des erfindungsgemäßen Enzyms sein. Obwohl es in den meisten Fällen als Einzelenzym bezeichnet werden muß, besitzt es die Wirkung eines Enzymkomplexes.

Beim Einsatz des erfindungsgemäßen Enzyms ist sein Reinigungsgrad ohne große Bedeutung. Es können z.B. die Fermentationsflüssigkeit selbst, das nach einer Ultrafiltration erhaltene enzymreichere Retentat oder das daraus gefällte Enzymprotein eingesetzt werden.

Es ist durchaus im Sinne der Erfindung, anstelle des aus einem konventionellen *Aspergillus*-Produktionsstamm gewonnenen Enzyms ein aus einem gentechnisch veränderten Produktionsstamm gewonnenes Enzym zu verwenden. Die Gentechnik bietet inzwischen eine Vielzahl von Möglichkeiten, das für die Bildung der Phospholipase benötigte Gen aus *Aspergillus* zu klonieren und in einem geeigneten Wirtstamm in hoher Ausbeute zu exprimieren. Als Wirtstämme kommen z.B. wieder *Aspergillus*-Stämme, aber auch andere Pilzstämme und sogar Bakterienstämme in Frage.

Die Einsatzmengen des Enzyms können entsprechend seinem Reinigungsgrad zwischen 0.0001 bis 1% bezogen auf das zu entschleimende Öl liegen.

-10-

Ein großer Vorteil und ein unerwarteter Effekt der erfindungsgemäß verwendeten Enzyme ist die für die Durchführung der Entschleimung notwendige Aktivität: Sie ist außerordentlich klein. Während im Stand der Technik bei Verwendung von Phospholipase A₂ aus Pankreas Aktivitäten von ca. 1000 Lecitase-Units (LU) pro 1 Liter Öl eingesetzt wurden (Siehe Beispiel 1 in der EP-A 0 513 709), genügen bei Verwendung der erfindungsgemäßen Enzyme aus *Aspergillus* unter den oben beschriebenen Bedingungen Aktivitäten von nur 5 bis 50 LU pro Liter Öl. Bei entsprechend verlängerter Reaktionszeit sind sogar Einsatzmengen von unter 5 LU pro Liter Öl zielführend.

Die in gereinigten *Aspergillus*-Phospholipasen gefundene Lysophospholipase-Aktivität liegt sogar höher als die Phospholipase A₂-Aktivität, und zwar um das 1 bis 100fache. Dadurch ergeben sich Einsatzmengen von 5 bis 5000 Lysolecitase-Units (LLU) pro Liter Öl, bevorzugt 50 bis 1000 LLU. Diese Aktivitätsangaben gelten für batchweise Entschleimungsansätze. Bei Wiederverwendung des Enzyms liegen die notwendigen Enzymzusätze bezogen auf 1 Liter Öl bedeutend niedriger, z.B. bei 1/5 bis 1/10 der obigen Werte. Diese geringen Enzymmengen erlauben es, daß auf eine Wiederverwendung des Enzyms auch verzichtet werden kann.

Es ist möglich, die erfindungsgemäße *Aspergillus* Phospholipase mit anderen acylspaltenden Phospholipasen gezielt abzumischen, z.B. mit weiteren Phospholipasen aus *Aspergillus* oder mit Phospholipase A₂ aus Pankreas. Im letzteren Fall muß allerdings ein pH-Wert eingestellt werden, der beiden pH-Optima nahekommt, also etwa pH 3-5.

Die Verwendung von Phospholipase aus *Aspergillus* ermöglicht überraschenderweise auch die Lösung weiterer gestellter Aufgaben. So ist es möglich, das Enzym in einer Citronensäurelösung einzusetzen, die Wirkung des Enzyms mit dem der Citronensäure zu vereinigen. Die Anwendung eines Enzyms in relativ konzentrierten Citronensäurelösungen

ist ungewöhnlich. In der Enzymologie sind kaum Enzyme bekannt, die bei so tiefen pH-Werten stabil sind und hier sogar ihr Wirkungsoptimum besitzen. Eines der wenigen Beispiele für ein derartiges Eigenschaftsspektrum ist das Pepsin des Verdauungstraktes. Das Enzym wird in einer 1-20%igen Citronensäurelösung gelöst. Dabei stellt man pH-Werte von $\text{pH} < 4$, bevorzugt pH-Werte von $\text{pH} < 3$ ein. Verwendet man z.B. 5%ige Citronensäurelösungen, so ergibt sich ein pH-Wert von ca. 2.3.

Anstelle von Citronensäure können auch Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Phosphorsäure, sowie andere anorganische und organische Säuren verwendet werden. Bevorzugt sind aber sind Genußsäuren, insbesondere Citronensäure. Anzumerken ist, daß mit Säurelösungen allein, also ohne Einsatz des Enzyms, keine ausreichend niedrigen Phosphorgehalte erzielt werden, insbesondere bei vorentschemten Ölen.

Das im erfindungsgemäßen Verfahren eingestellte pH-Optimum von 2-3 stimmt nicht mit dem nach üblichen analytischen Verfahren gefundenen pH-Optimum überein. Letzteres liegt bei $\text{pH} = 8$, wobei Eigelb als Substrat bei 40 C in der Enzymlösung emulgiert wird und die Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt wird. Das überraschend niedrige pH-Verfahrensoptimum könnte man mit den besonderen Bedingungen der Phasengrenzfläche erklären, wo sich vielleicht ein höherer pH-Wert einstellt, als er in der Wasserphase ("bulk-Phase") gemessen wird.

Das Enzym wird in dieser sauren wäßrigen Lösung mit dem Öl innig vermischt. Dabei sollte man bestrebt sein, die Wasserphase im Vergleich zur Ölphase möglichst klein zu halten, um bei deren anschließendem Abscheiden möglichst kleine Volumina bewegen zu müssen. In der Regel kommt man mit Volumina $< 10\%$ bezogen auf die Ölphase aus, bevorzugt mit Volumina $< 5\%$. In jedem Fall entsteht eine Wasser-in-Öl-Emulsion.

-12-

Die zu behandelnde Ölphase kann Sojaöl sein, Sonnenblumenöl oder Rapsöl. Ersteres ist das wichtigste Ölprodukt. Andere pflanzliche Öle, wie Leinöl, Cocosöl oder Palmöl, sowie tierische Öle, die störende Phosphatide enthalten, können ebenfalls nach dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt werden.

Da die Phospholipase Lecithin angreifen würde, ist es nicht sinnvoll, hoch lecithinhaltige Öle, wie rohes Sojaöl, in dem erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzen. Ausgangsstoffe sind daher vorentsleimte, insbesondere wasserentsleimte Öle, die sich in der Regel durch einen Phosphorgehalt zwischen 50 und 300ppm auszeichnen. Nur ausnahmsweise besitzen vorentsleimte Öle höhere Phosphorgehalte, kaum jemals über 500ppm Phosphor.

Öle schwankender Qualität können auf der gleichen Anlage verarbeitet werden. Es ist auch möglich, teilentleimte Öle, sowie Preßöle oder Extraktionsöle mit einzusetzen, und zwar in Abmischung mit vorentsleimten Ölen.. Ausnahmsweise kann der Phosphorgehalt dann ebenfalls über 500 ppm liegen.

Eine vorherige Trocknung des Öls ist entbehrlich.

Um das Enzym wirken lassen zu können, müssen beide Phasen, die Ölphase und die enzymhaltige Wasserphase innig miteinander vermischt werden. Bloßes Umrühren reicht bei weitem nicht aus.

Eine gute Verteilung des Enzyms im Öl ist gewährleistet, wenn es in einer geringen Wassermenge von 0.5-5 Gew.% (bezogen auf Öl) gelöst und in dieser Form in dem Öl zu Tröpfchen von weniger als 10 Mikrometer Durchmesser (Gewichtsmittelwert) emulgiert wird. Bevorzugt sind die Tröpfchen kleiner als 1 Mikrometer. Turbulentes Rühren mit Radialgeschwindigkeiten über 100 cm/sec hat sich bewährt. Stattdessen kann das Öl mit Hilfe einer externen Kreiselpumpe im Reaktor umgewälzt werden. Auch mittels Ultraschalleinwirkung läßt sich die enzymhaltige

Wasserphase fein verteilen. Üblich ist ein Dispergierer wie z.B. Ultraturrax.

Die enzymatische Reaktion dürfte an der Grenzfläche zwischen der Ölphase und der Wasserphase stattfinden. Es ist das Ziel all dieser Maßnahmen zur Vermischung, für die enzymhaltige Wasserphase eine möglichst große Oberfläche zu erzeugen. Der Zusatz von Tensiden verstärkt die Feinverteilung der Wasserphase. Fallweise werden daher der Enzymlösung Tenside mit HLB-Werten von über 9, wie Na-Dodecylsulfat zugesetzt, wie in EP-A 0 513 709 beschrieben. Eine ähnlich wirksame Methode zur Verbesserung der Emulgierung ist der Zusatz von Lysolecithin. Die Zusatzmengen können bei 0.001% bis 1% bezogen auf Öl liegen. In allen Fällen werden beim erfindungsgemäßen Verfahren hochdisperse Wasser-in-Öl-Emulsionen erzeugt.

Die Temperatur bei der Enzymbehandlung ist nicht kritisch. Temperaturen zwischen 20 und 80 °C sind geeignet, letztere darf allerdings nur kurzzeitig angewandt werden. Die erfindungsgemäße Phospholipase zeichnet sich insgesamt durch eine gute Temperaturbeständigkeit aus. Sie wird durch den niedrigen Anwendungs-pH nicht beeinträchtigt. Optimal sind Anwendungstemperaturen von 30-50 °C.

Die Behandlungsdauer hängt von der Temperatur ab und kann mit zunehmender Temperatur kürzer gehalten werden. Zeiten von 0,1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 5 Stunden sind in der Regel ausreichend. Die Reaktion erfolgt in einem Entschleimungsreaktor, der in Etagen aufgeteilt werden kann, wie in DE-A 43 39 556 beschrieben. Somit ist neben einer batchweisen Fahrweise auch ein kontinuierlicher Betrieb möglich. Die Reaktion kann dabei auch in verschiedenen Temperaturstufen durchgeführt werden. So kann z.B. 3 Stunden lang bei 40 °C, danach 1 Stunde bei 60 °C inkubiert werden. Ein stufenweiser Ablauf der Reaktion eröffnet auch die Möglichkeit, in den einzelnen Stufen verschiedenen pH-

- 14 -

Werte einzustellen. So kann in einer ersten Stufe der pH-Wert der Lösung z.B. auf 7 eingestellt werden, in einer zweiten Stufe unter Zugabe von Citronensäure auf 2.5. In mindestens einer Stufe muß aber der pH-Wert der Enzymlösung erfindungsgemäß unter 4, bevorzugt unter 3 liegen. Bei der nachträglichen pH-Einstellung unter diese erfindungsgemäße Marke wurde eine Wirkungsverschlechterung beobachtet. Daher wird die Citronensäure bevorzugt der Enzymlösung vor deren Einmischung ins Öl zugesetzt.

Nach Abschluß der Enzymbehandlung wird die Enzymlösung mitsamt der darin aufgenommenen Abbauprodukte der NHP - batchweise oder kontinuierlich - von der Ölphase abgetrennt, vorzugsweise durch Zentrifugieren. Da sich die Enzyme durch eine hohe Stabilität auszeichnen und die Menge der aufgenommenen Abbauprodukte gering ist - sie fallen als Schlamm aus - kann die gleiche wäßrige Enzymphase mehrmals wiederverwendet werden. Es besteht auch die Möglichkeit, entsprechend DE-A 43 39 556 das Enzym vom Schlamm abzulösen, sodaß eine weitgehend schlammfreie Enzymlösung wiedereingesetzt werden kann.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der Entschleimung werden Öle erhalten, die weniger als 15 ppm Phosphor enthalten. Das eigentliche Ziel sind Phosphorgehalte von weniger als 10 ppm; im Idealfall sollten es weniger als 5ppm sein. Mit Phosphorgehalten unter 10ppm ist die Weiterverarbeitung des Öls nach dem Verfahren der destillativen Entsäuerung ohne weiteres möglich.

Im Zuge des erfindungsgemäßen Verfahrens werden auch eine Reihe andere Ionen wie Magnesium, Calcium, Zink, sowie auch Eisen weitgehend aus dem Öl entfernt. Dank des erreichten niedrigen Eisengehaltes, meist unter 0.1 ppm, hat das Produkt ideale Voraussetzungen für eine gute Oxidationbeständigkeit bei der Weiterverarbeitung und bei der Lagerung.

BEISPIELE

Beispiel 1

500g naßentschleimtes Sojaöl mit einem Rest-Phosphorgehalt von 190ppm wird in einem Rundkolben auf 40 C erwärmt. Dazu gibt man 26 g Wasser, in dem 5 g Citronensäure und 0.19 g eines pulverförmigen Enzympräparats gelöst worden waren. Das Enzympräparat stammt aus einer Produktionscharge einer *Aspergillus niger*-Fermentation und enthält 60 Phospholipase Einheiten (=Lecitase-Units, LU) pro g. 1 Lecitase-Unit (LU) ist jene Enzymmenge, die bei 40 C, pH=8, aus Eigelb in einer Minute 1 Mikromol Fettsäure freisetzt. Das Enzympräparat wurde auch auf Lysophospholipase-Aktivität überprüft. Es wurden 1001 Lysophospholipase-Einheiten (=Lysolecitase-Units, LLU) pro g gemessen. 1 Lysolecitase-Unit ist jene Enzymmenge, die bei 55 C, pH=4.5, aus einer Lysolecithin-Emulsion 1 Mikromol Fettsäure pro Minute freisetzt. Das Enzympräparat, das im Hinblick auf den Gehalt an Phospholipasen nicht extra aufgereinigt wurde, enthält also neben Phospholipase A₂ eine bemerkenswert hohe Aktivität an Lysophospholipase und könnte als Phospholipase B. bezeichnet werden.

Der Inhalt des Rundkolbens wird mittels einer externen Kreiselpumpe intensiv dispergiert. Dabei wird der Inhalt des Kolbens etwa einmal pro Minute durchgesetzt. Die Wasserphase liegt dabei in einer Teilchengröße von unter 1µm vor. In Zeitabständen von einer Stunde werden Proben genommen und auf Phosphorgehalt untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

-16-

Zeit in Stunden	0	2	4	6	20
Phosphorgehalt in ppm	190	81	27.9	5.4	4.2

Der für eine nachfolgende destillative Entsäuerung benötigte niedrige Phosphorgehalt von <10ppm wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren in 6 Stunden erreicht.

Vergleichsversuch 1

Es wird wie in Beispiel 1 gearbeitet, nur wird anstelle des Enzympräparats eine entsprechende Menge an Molkenprotein, also nichtenzymatisches Protein zugesetzt. Die nach den gleichen Behandlungszeiten wie oben genommenen Proben zeigen, daß die Phosphorgehalte durch eine enzymfreie Behandlung nicht unter 121ppm absinken. Citronensäure-Zusatz allein genügt demnach nicht. Das erhaltenen Öl ist für eine destillative Entsäuerung nicht geeignet.

Zeit in Stunden	0	2	4	6	20
Phosphorgehalt in ppm	190	152	128	123	121

Vergleichsversuch 2

Es wird wie in Beispiel 1 gearbeitet, nur wird anstelle der Phospholipase aus *Aspergillus* eine reine Lysophospholipase des Handels (G-Zyme, von

Enzyme Biosystems, USA, 1172 LLU pro g) eingesetzt. Sie besitzt keine Phospholipase A₂-Aktivität. Die nach den gleichen Behandlungszeiten wie oben genommenen Proben zeigen, daß die Phosphorgehalte durch den Einsatz von Lysophospholipase allein unter den vorgegebenen Bedingungen nicht unter 85ppm absinken. Das erhaltenen Öl ist für eine destillative Entsäuerung nicht geeignet.

Zeit in Stunden	0	2	4	6	20
Phosphorgehalt in ppm	190	138	124	119	85

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Verminderung von in pflanzlichen Ölen enthaltenen phosphorhaltigen Bestandteilen durch deren enzymatischen Abbau mit acylspaltender Phospholipase

dadurch gekennzeichnet,

daß ein Aspergillus stammendes Enzyme eingesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym sowohl Phospholipase A₂ - Aktivität (EC - Nr. 3.1.1.4) und/oder Phospholipase A₁ - Aktivität (EC - Nr. 3.1.1.32), als auch Lysophospholipase - Aktivität (EC - Nr. 3.1.1.5) enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der eingesetzten Enzymlösung auf < 4, bevorzugt < 3 eingestellt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert mit Citronensäure eingestellt wird, das Enzym somit in Gegenwart der Citronensäure wirkt.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß es bei Temperaturen von 20 bis 80 C, bevorzugt bei 30 bis 50 C ausgeführt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die das Enzym enthaltende Wasserphase im Öl zu Tröpfchen einer Größe unter 10 Mikrometer emulgiert wird.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6 dadurch gekennzeichnet, daß zumindest teilweise vorentsleimtes, insbesondere naßentsleimtes Öl eingesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Phosphorgehalt von 50 bis 500 ppm im Öl auf weniger als 15 ppm, bevorzugt auf weniger als 10ppm, im besten Fall auf weniger als 5ppm reduziert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Sojaöl verarbeitet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Raps- oder Sonnenblumenöl verarbeitet wird.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Lösung der Phospholipase nach der Einwirkung von dem behandelten Öl abgetrennt und erneut verwendet wird.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß es chargenweise durchgeführt wird.

-20-

13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß es kontinuierlich durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig mit der Verminderung des Gehalts an phosphorhaltigen Bestandteilen auch der Eisengehalt des Öls vermindert wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C11B3/00 C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C11B C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 513 709 (RÖHM GMBH) 19 November 1992 cited in the application see the whole document ---	1-14
Y	EP,A,0 575 133 (SANKYO COMPANY LIMITED) 22 December 1993 see page 5, line 19 - line 26 see page 8, line 14 - line 50 see examples 1-6 see claims 1-39 ---	1-14
Y	US,A,5 314 706 (KADISLAS COLAROW ET AL.) 24 May 1994 see column 1, line 63 - line 68 ---	1-14
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search: 7 October 1996

Date of mailing of the international search report: 22 10 96

Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.B. 5118 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer: Dekeirel, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01190

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 219 269 (CPC INTERNATIONAL INC.) 22 April 1987 cited in the application see page 4, paragraph 1 - page 5, last paragraph see page 6, paragraph 4 see claims 8,11	1-14
A	--- PROCESS BIOCHEMISTRY, vol. 30, no. 5, 1995, GB, pages 393-401, XP000603907 A. MISTRANTA ET AL.: "Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids" see the whole document	1,2
A	--- US,A,5 288 619 (PETER H. BROWN ET AL.) 22 February 1994 see column 19, line 34 - line 58 see column 21, line 45-48 see column 70, line 9 - line 16	1
A	--- EP,A,0 622 446 (SHOWA SANGYO CO., LTD.) 2 November 1994 cited in the application see the whole document	1
A	--- DATABASE WPI Week 9304 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-030369 XP002014555 & JP,A,04 356 192 (KANEKA CORP) , 9 December 1992 see abstract	1
A	--- DATABASE WPI Week 9304 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-030368 XP002014556 & JP,A,04 356 191 (KANEKA CORP) , 9 December 1992 see abstract	1
A	--- DATABASE WPI Week 9507 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-047898 XP002014557 & JP,A,06 327 475 (NISSHIN OIL MILLS LTD) , 29 November 1994 see abstract	1

2

-/--

Form PCT/ISA/218 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 3

BNSDOCID: <WO 9705219A1>

NZAS-0008899

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01190

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p> DATABASE WPI Week 8705 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-033297 XP002014558 & JP,A,61 289 884 (ASAHI DENKA KOGYO) , 19 December 1986 see abstract ----- </p>	1

2

Form PCT/ISA/218 (continuation of second sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/DE 96/01190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-513709	19-11-92	DE-A- 4115938	19-11-92
		AT-T- 120482	15-04-95
		CA-A, C 2068933	17-11-92
		CN-A- 1066679	02-12-92
		DE-D- 59201753	04-05-95
		ES-T- 2072043	01-07-95
		HU-A- 64578	28-01-94
		RU-C- 2033422	20-04-95
		US-A- 5264367	23-11-93
EP-A-575133	22-12-93	AU-B- 667217	14-03-96
		AU-A- 4130893	23-12-93
		CA-A- 2098421	17-12-93
		JP-A- 7031472	03-02-95
		NZ-A- 247891	26-10-94
		US-A- 5378623	03-01-95
		US-A- 5538874	23-07-96
		US-A- 5521080	28-05-96
		JP-A- 6062850	08-03-94
US-A-5314706	24-05-94	EP-A- 0546215	16-06-93
		AU-B- 659699	25-05-95
		AU-A- 2976292	17-06-93
		BR-A- 9204994	15-06-93
		CA-A- 2084687	13-06-93
		HU-A- 66650	28-12-94
		NZ-A- 245154	24-02-95
		ZA-A- 9209193	14-06-93
EP-A-219269	22-04-87	AU-B- 604216	13-12-90
		AU-A- 6365186	16-04-87
		CA-A- 1293212	17-12-91
		DE-A- 3681396	17-10-91
		FI-B- 92718	15-09-94
		IE-B- 59003	15-12-93
		JP-B- 7040952	10-05-95
		JP-A- 62111695	22-05-87
US-A- 4916064	10-04-90		
US-A-5288619	22-02-94	AU-A- 6979491	18-07-91

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/DE 96/01190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5288619		CA-A- 2031936 GB-A,B 2239256 IT-B- 1242182 WO-A- 9108677 AU-A- 6785490 CA-A- 2031945 WO-A- 9108676	19-06-91 26-06-91 16-02-94 27-06-91 20-06-91 19-06-91 27-06-91
EP-A-622446	02-11-94	JP-A- 7011283 US-A- 5532163 CA-A- 2122069	13-01-95 02-07-96 26-10-94

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1993)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01190

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C11B3/00 C12N9/16		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C11B C12N C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 513 709 (RÖHM GMBH) 19.November 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-14
Y	EP,A,0 575 133 (SANKYO COMPANY LIMITED) 22.Dezember 1993 siehe Seite 5, Zeile 19 - Zeile 26 siehe Seite 8, Zeile 14 - Zeile 50 siehe Beispiele 1-6 siehe Ansprüche 1-39 ---	1-14
Y	US,A,5 314 706 (KADISLAS COLAROW ET AL.) 24.Mai 1994 siehe Spalte 1, Zeile 63 - Zeile 68 ---	1-14
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : * "A" Veröffentlichung, die dem allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist * "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist * "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden * "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist * "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. Oktober 1996		Abendedatum des internationalen Recherchenberichts 22. 10. 96
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Dekeirel, M

Formblatt PCT/ISA/218 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01190

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p> DATABASE WPI Week 8705 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-033297 XP002014558 & JP,A,61 289 884 (ASAHI DENKA KOGYO) , 19.Dezember 1986 siehe Zusammenfassung ----- </p>	1

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01190

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-513709	19-11-92	DE-A- 4115938	19-11-92
		AT-T- 120482	15-04-95
		CA-A,C 2068933	17-11-92
		CN-A- 1066679	02-12-92
		DE-D- 59201753	04-05-95
		ES-T- 2072043	01-07-95
		HU-A- 64578	28-01-94
		RU-C- 2033422	20-04-95
		US-A- 5264367	23-11-93
EP-A-575133	22-12-93	AU-B- 667217	14-03-96
		AU-A- 4130893	23-12-93
		CA-A- 2098421	17-12-93
		JP-A- 7031472	03-02-95
		NZ-A- 247891	26-10-94
		US-A- 5378623	03-01-95
		US-A- 5538874	23-07-96
		US-A- 5521080	28-05-96
		JP-A- 6062850	08-03-94
US-A-5314706	24-05-94	EP-A- 0546215	16-06-93
		AU-B- 659699	25-05-95
		AU-A- 2976292	17-06-93
		BR-A- 9204994	15-06-93
		CA-A- 2084687	13-06-93
		HU-A- 66650	28-12-94
		NZ-A- 245154	24-02-95
		ZA-A- 9209193	14-06-93
EP-A-219269	22-04-87	AU-B- 604216	13-12-90
		AU-A- 6365186	16-04-87
		CA-A- 1293212	17-12-91
		DE-A- 3681396	17-10-91
		FI-B- 92718	15-09-94
		IE-B- 59003	15-12-93
		JP-B- 7040952	10-05-95
		JP-A- 62111695	22-05-87
		US-A- 4916064	10-04-90
US-A-5288619	22-02-94	AU-A- 6979491	18-07-91

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie/Juli 1997)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01190

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5288619		CA-A- 2031936	19-06-91
		GB-A, B 2239256	26-06-91
		IT-B- 1242182	16-02-94
		WO-A- 9108677	27-06-91
		AU-A- 6785490	20-06-91
		CA-A- 2031945	19-06-91
		WO-A- 9108676	27-06-91

EP-A-622446	02-11-94	JP-A- 7011283	13-01-95
		US-A- 5532163	02-07-96
		CA-A- 2122069	26-10-94

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)